

Геном еукаріотичних організмів

- **Особливості організації геному еукаріот**
- **Типи нуклеотидних послідовностей: багатокопійні, помірно повторені, унікальні**
- **Мультигенні родини**
- **Класи генів еукаріот**
- **Мобільні генетичні елементи**
- **Цитоплазматична спадковість. Геноми клітинних органел**

Особливості організації генома еукаріот

- Великі розміри і складна організація
- Нуклеосомна структура хроматину
- Переважають в геномі А - Т пари
- Індивідуальні гени мають перервну (екзон-інтронну будову); для первинних РНК-транскриптів характерний процесинг
- Наявні псевдогени, складні генетичні локуси, мобільні генетичні елементи
- Більшість генів згруповані у мультигенні родини

- Гени є самостійними транскрипційними одиницями (мРНК є моногенною), нема оперонної організації
- Високий відсоток повторених (кодуючих і некодуючих) нуклеотидних послідовностей
- Великі міжгенні спейсери та різноманітні регуляторні послідовності
- Ядерно-цитоплазматичне просторове роз'єднання молекулярно-генетичних процесів
- Складні регуляторні механізми (на різних рівнях експресії генів)
- Наявність автономних геномів клітинних органел

Компоненти геному еукаріотичних організмів:

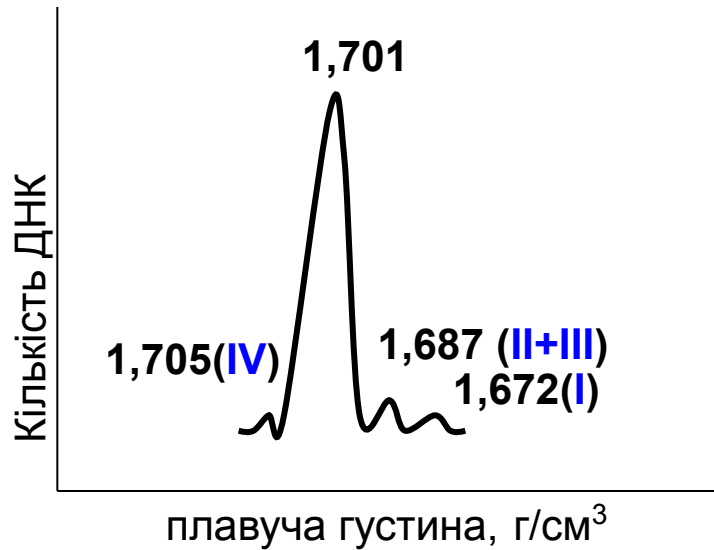
- ❑ Хромосоми
- ❑ Геноми мітохондрій (1-20% сумарної ДНК)
- ❑ Геноми хлоропластів (1-10% сумарної ДНК)
- ❑ Мобільні генетичні елементи (10-20% сумарної ДНК)
- ❑ Плазміди (в клітинах нижчих еукаріотів)

Порівняно з прокаріотичними організмами в еукаріотів:

- ❑ Зростають розміри генома до 10^7 - 10^{12} п.н.
- ❑ Зростає в ~ 10-100 разів кількість генів
- ❑ Зростають в 5 – 15 разів розміри генів
- ❑ Значна частка геномів еукаріотичних організмів припадає на ділянки ДНК, що повторюються:
 - Розмір послідовності, що повторюється – від 1 нуклеотиду до декількох т.п.н.
 - Частота повторень певних нуклеотидних послідовностей: від 2 до $>10^6$ разів
 - Величина фракції повторень варіює від ~10% (нижчі еукаріоти) до ~80% (амфібії)

Сателітні ДНК виявляються як додаткові фракції під час ультрацентрифування

Центромерна сателітна ДНК *D. melanogaster*

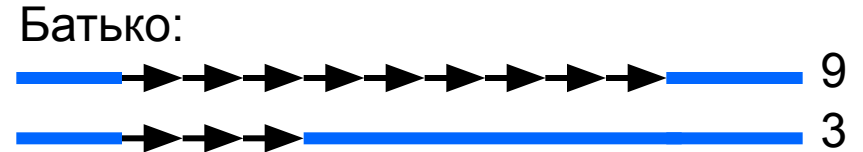
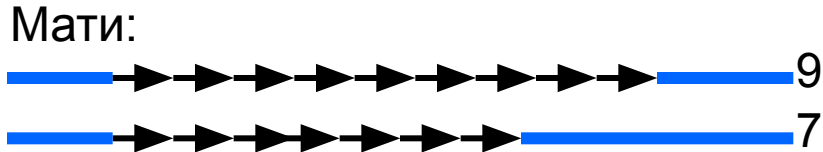
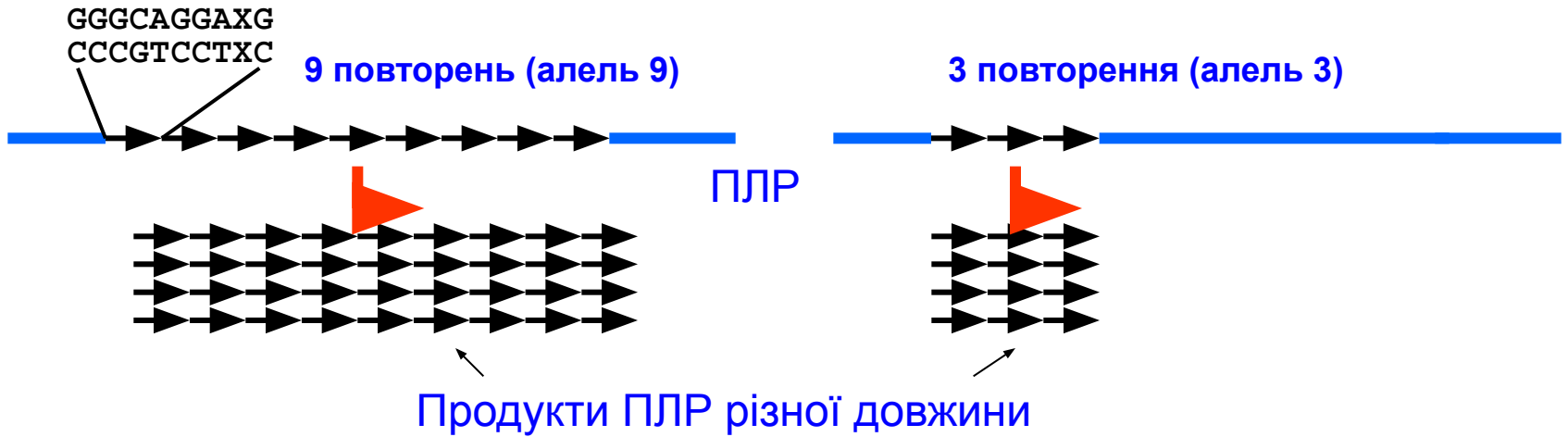


сателіт	% геномної ДНК	Повторення
I	2	5' - [AATAT] _n
	1	5' - [AATATAT] _n
II	3	5' - [AATAACATAG] _n
III	5	254 та 359 п.н.
IV	4	5' - [AAGAG] _n
	0,5	5' - [AAGAGAG] _n

Частка центромерної сателітної ДНК

Вид	%
<i>Drosophila melanogaster</i>	16
<i>Mus musculus</i>	8
<i>Homo sapiens</i>	5

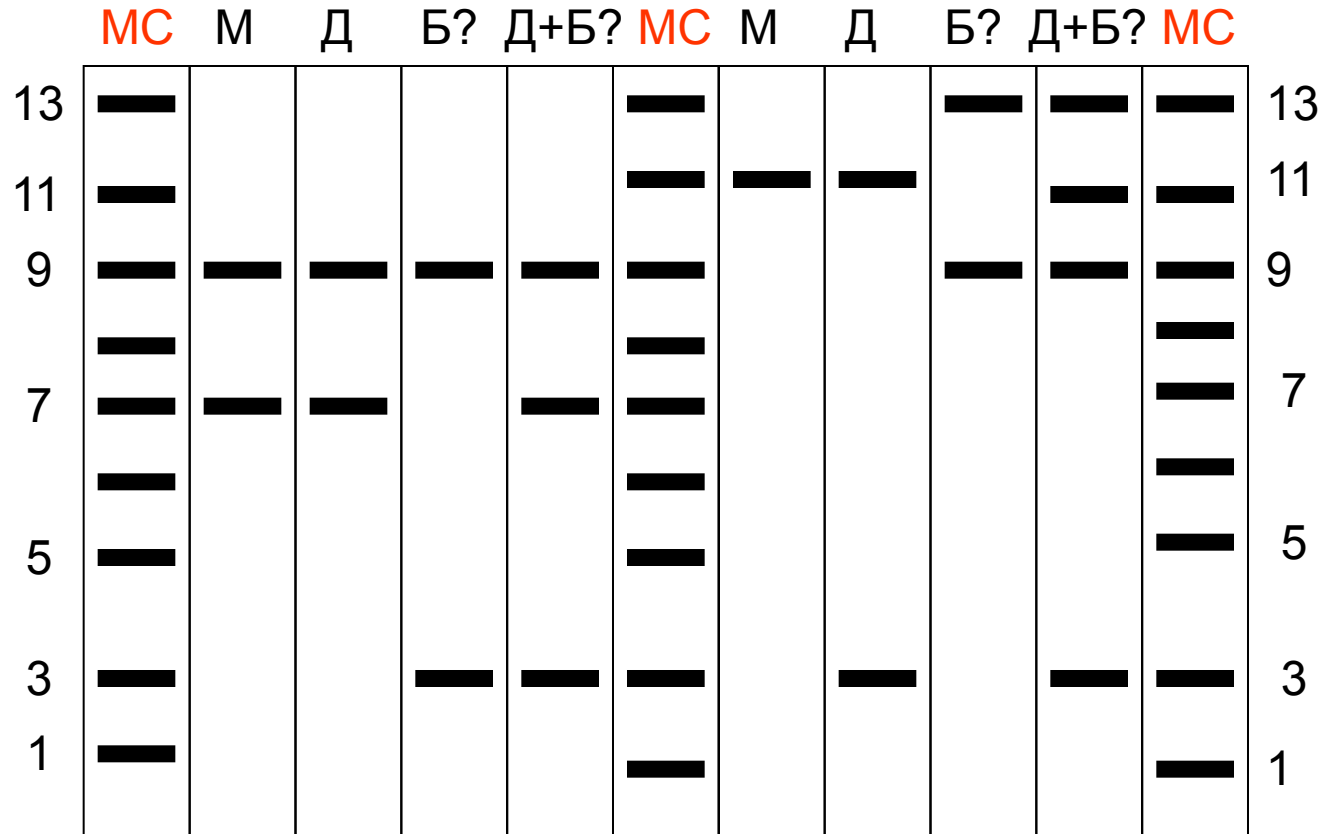
Аналіз мінісателітних послідовностей за допомогою ПЛР



Діти: 9,9; 9,3; 7,9; 7,3

Встановлення батьківства за допомогою ПЛР- аналізу повторень ДНК в локусі D1S80

А. Результати електрофоретичного розділення продуктів ПЛР



Підтвердження батьківства

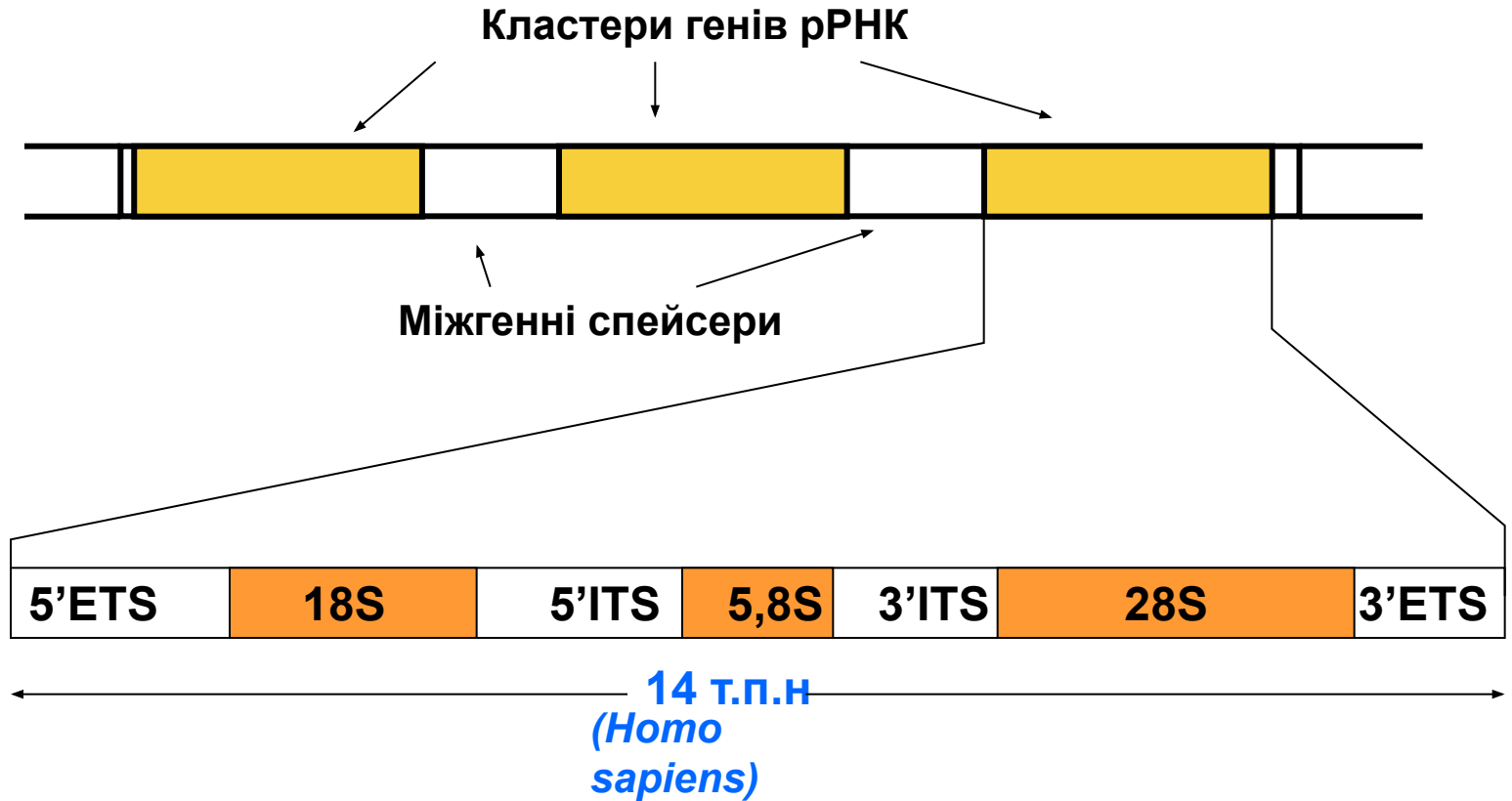
Виключення батьківства

МС – маркерна суміш алелів; **М** – мати; **Д** – дитина; **Б?** – імовірний батько; **Д+Б?** – дитина+імовірний батько

Гени гістонів

	Порядок генів в кластері	Розміри кластера, т. п.н.	Кількість копій
<i>S. cerevisiae</i>	1) H2A H2B 2) H3 H4	6 13	2 2
<i>D. melanogaster</i>	H3 H4 H2A H2B H1	5	100
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	H1 H4 H2B H3 H2A	6-7	500 (ранні) 10 (пізні)
<i>H.sapiens</i>	H3 H4 H4 H3 H2A H2B H4 H3 H1 H2B H2A	20 15	10-20 5

Будова кластерів генів рРНК



ETS – зовнішній спейсер, що транскрибується (*external t ranscribed s pacer*)

ITS – внутрішній спейсер, що транскрибується (*i nternal t ranscribed s pacer*)

Гени рРНК транскрибує РНК-полімераза I

Локалізація, кількість копій та розміри одиниць транскрипції генів рРНК

	Хромосоми	К-сть копій на гаплоїдний геном	Розмір транскрипційної одиниці, (т. п.н.)
<i>S. cerevisiae</i> *	12	100	7
<i>D. melanogaster</i>	X, Y	200	8
<i>H. sapiens</i>	13, 14, 15, 21, 22	150 - 200	14
<i>Z. mays</i>	6	3000 - 9000	14

*Кластер генів рРНК *S. cerevisiae* включає гени 5S, 18S, 5,8S та 25S рРНК

Гени 5S рРНК транскрибуються РНК-полімеразою III

	Хромосоми	К-сть копій на гаплоїдний геном
<i>D. melanogaster</i>	2	160
<i>Xenopus laevis</i>	Теломерні райони	400 (соматичні клітини) 20000 (ооцити)
<i>H. sapiens</i>	1	Біля 2000

Гени тРНК

- ❑ Транскрибуються РНК-полімеразою III
- ❑ Промотор генів в кодуючій частині
- ❑ Гени тРНК можуть мати інтрони, або не мати їх. Інтрони зазвичай короткі (~14-60 п.н.) та розташовані з 3'-кінця від ділянки, яка кодує антикодон тРНК (область антикодонової петлі)
- ❑ Є множинні копії генів тРНК, немає певної впорядкованої організації цих генів – можуть утворювати кластери, або бути поодинокими, диспергованими
- ❑ У геномі дріозофіли ~50 локусів, де локалізовані гени тРНК
- ❑ В геномі людини виявлено 497 функціональних та 324 псевдогени тРНК
- ❑ Більше 50% генів тРНК локалізовано в 1, або 6 хромосомі людини
- ❑ Кожна з хромосом 3, 4, 8, 9, 10, 12, 18, 20 та 21 містить близько 10 генів тРНК. Таких генів зовсім немає в хромосомах 22 та Y

Гени мяРНК та мцРНК

- ❑ Малі стабільні РНК – компоненти нуклеопротейдних частинок ядра (мяРНК) або цитоплазми (мцРНК)
- ❑ Частина мяРНК бере участь у процесингу первинних транскриптів в зрілі мРНК як компоненти сплайсосом
- ❑ Роль мцРНК вивчена гірше. Молекули 7SL і 7 SK є компонентом частинок, що зумовлюють внутрішньоклітинне переміщення поліпептидів

Назва	Розмір (нуклеотидів)	Кількість копій	Дисперговані (Д) /утворюють кластери (К)	Транскрибуються РНК-полімеразою
U1 (мяРНК)	164	30 (людина) 500 (<i>Xenopus</i>)	К К та Д	II
U6 (мяРНК)	107-108	200 (миша) 3 (дрозофіла)	Д К	III
7SL мцРНК	300 254	3-4 (людина) 2 (дрозофіла) 1 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)		III

- ***Псевдогени*** – ділянки геному, близькі у структурному відношенні до специфічних функціональних генів, але не є їхніми алельними формами і не кодують активних продуктів.
- Містять мутації в регуляторних або кодуючих областях.
- Виникають у результаті зворотної транскрипції; матрицею служать різні типи РНК, часто неправильно процесовані.
- Якщо ДНК-копія містить ВРЗ, то відбувається експресія такого ретрогена.
- У 21 хромосомі людини є 225 функціональних генів і 59 псевдогенів

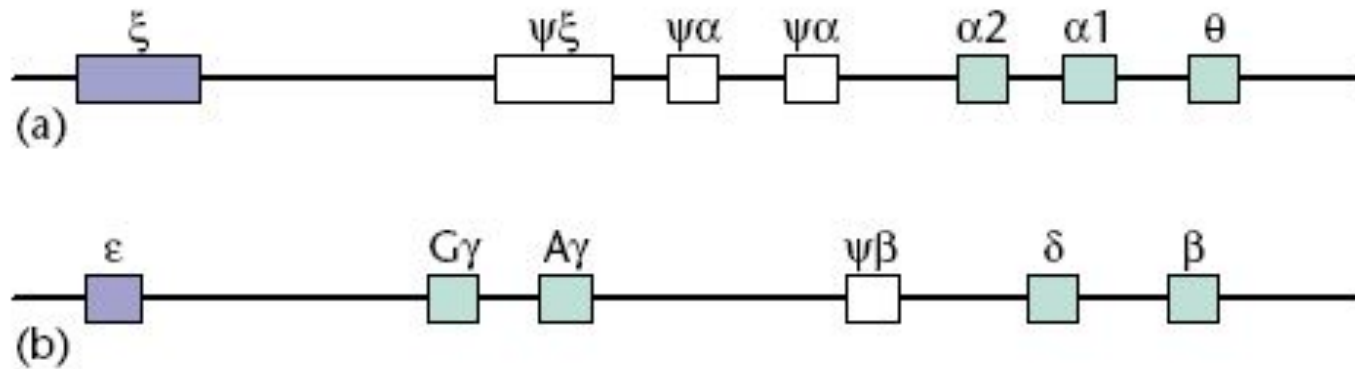
Мультигенні родини

Об'єднують декілька ідентичних або подібних за структурою генів, які кодують ідентичні або близькі за функцією продукти

Типи МГР

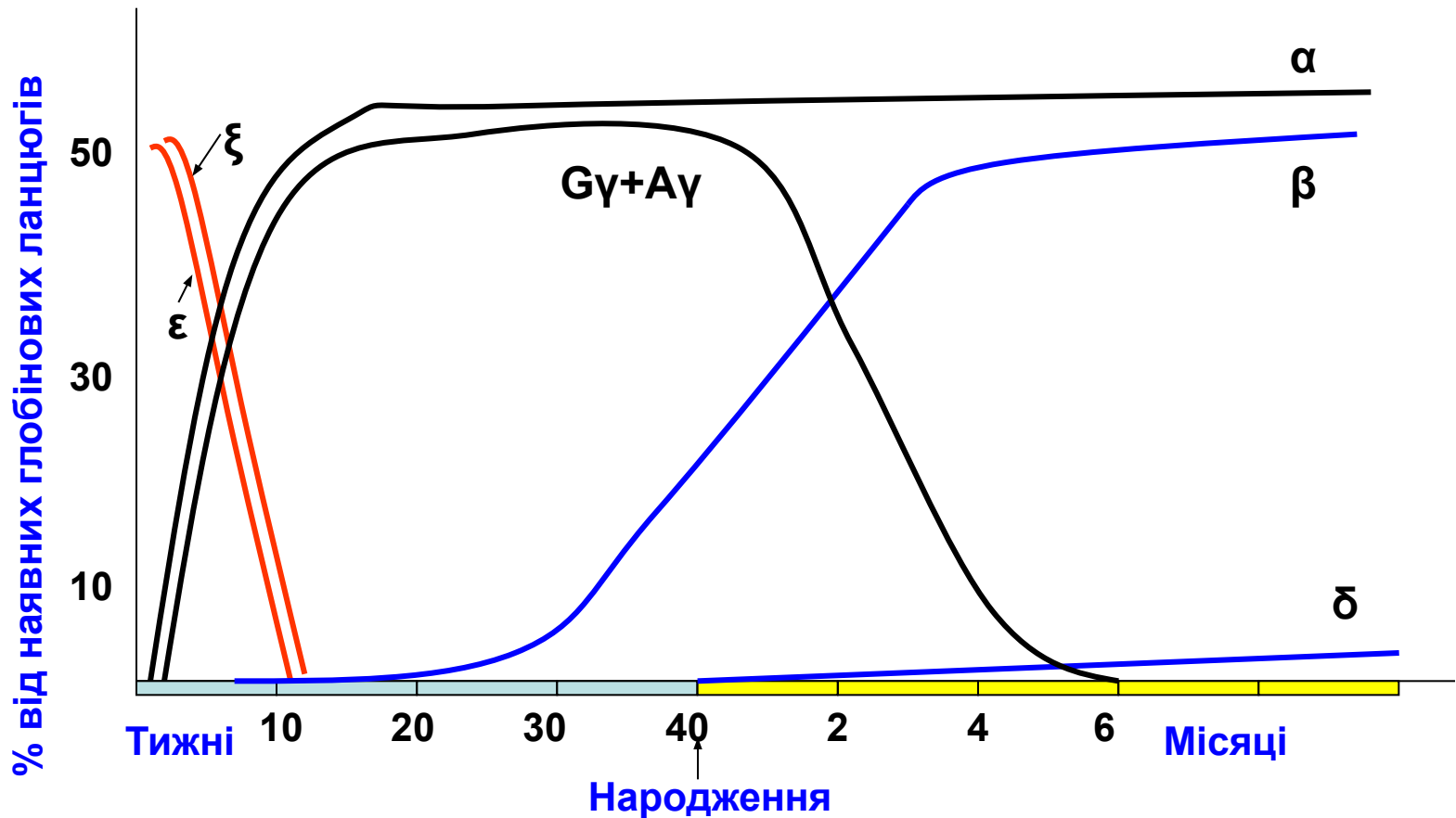
1. Тандемно повторені гени або кластери генів. Всі тандеми однакові та кодують одні і ті ж продукти. Так організовані гени, продукти яких повинні утворюватися у великій кількості за короткий час.
2. Близькі за структурою гени, які кодують споріднені білки. Не утворюють повторів.
3. Дисперговані по геному гени та мобільні генетичні елементи

Родина глобінових генів людини



- a) Кластер α -глобінових генів людини – 16 хромосома; 25 т.п.н.
- b) Кластер β -глобінових генів людини – 11 хромосома; 65 т.п.н.

Експресія генів глобінів в онтогенезі людини



Онтогенетичні варіанти Hb людини

Стадія розвитку	Тип Hb	Структура Hb
Ембріон	Gower I Gower II Portland I	$\zeta_2\varepsilon_2$ $\alpha_2\varepsilon_2$ $\zeta_2\gamma_2$
Плід	Hb-F	$\alpha_2\gamma_2^G$ $\alpha_2\gamma_2^A$
Доросла особина	Hb-A Hb-A ₂	$\alpha_2\beta_2$ $\alpha_2\delta_2$

Класи генів еукаріот

- **I клас генів** транскрибується РНК-полімеразою I. Це гени рРНК-кластерів. Кластери утворюють тандемні повтори. Фермент локалізований у ядерцях, на його активність припадає біля 50% загальної РНК-полімеразної активності в клітині. *Регуляторні промоторні послідовності містяться у міжгенних спейсерах.*
- **II клас генів** транскрибується РНК-полімеразою II (20-40% РНК-полімеразної активності). Це всі гени, які кодують поліпептиди (структурні та регуляторні білки), та гени мяРНК (крім U6 РНК). Оскільки фенотип будь-якої диференційованої клітини передовсім залежить від пулу в ній певних білків, то **експресія цього класу генів є визначальною у забезпеченні процесів клітинної диференціації.** *Промотори для експресії є перед генами.*
- **III клас генів** транскрибується РНК-полімеразою III. Ці гени не кодують білків, їх продуктами є малі РНК, які беруть участь у білковому синтезі (5S рРНК, тРНК); у посттранскрипційному процесингу (U6 РНК); у внутрішньоклітинному транспорті білків (мцРНК). *Регуляторні послідовності містяться здебільшого у кодуючій області гена.*

Мобільні генетичні елементи (МГЕ) еукаріот



Барбара МакКлінток (1902-1992)

Відкрила МГЕ кукурудзи в 1948 р.
Нобелівську премію за відкриття
МГЕ отримала в 1983 р.

ДНК-транспозони - містять **ген транспозази** та інвертовані повторення послідовностей ДНК на кінцях, необхідні для транспозиції (контролюючі елементи кукурудзи, Р-елемент дрозофіли). Подібні до транспозонів прокариот.

Під час їх транспозиції формуються **дуплікації ДНК-мішені**.

Транспозиції цих елементів ведуть до сильних мутагенних наслідків.

Ретротранспозони:

Клас I - фланковані довгими термінальними повтореннями (LTR). На флангах LTR - короткі (декілька п.н.) прямі або інвертовані повторення (соріа-подібні елементи дрозофіли, Ту дріжджів)

Клас II - не містять LTR (LINE I родина ссавців, F і I - елементи дрозофіли). Активно транскрибуються.

Під час їх транспозиції формуються **дуплікації ДНК-мішені**.

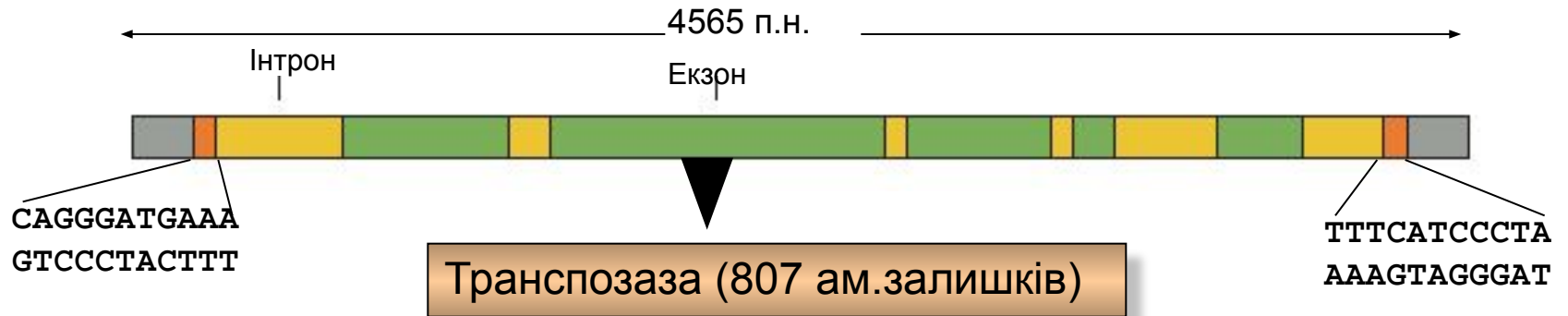
Кодують **зворотні транскриптази** та інші білки, подібні до білків ретровірусів. Зворотні транскриптази синтезують ДНК-копії транскриптів, які інтегруються в нові сайти генома.

Ретрогени (ретропозони)- переміщуються за допомогою зворотної транскрипції. Це копії ДНК, синтезовані на різних типах РНК. **Не кодують зворотної транскриптази**.

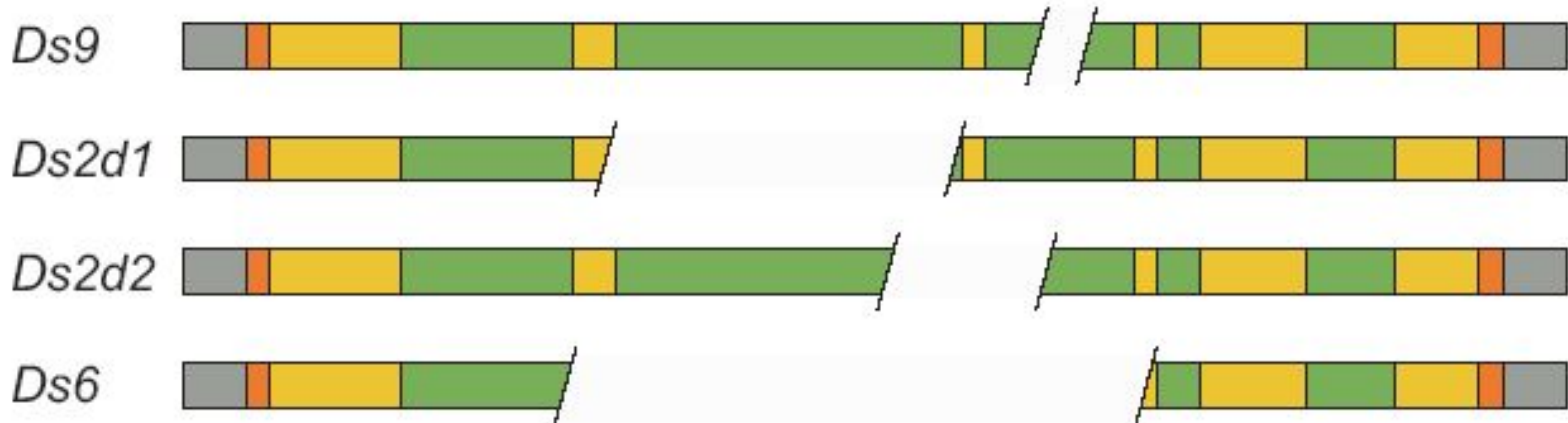
Використовують зворотну транскриптазу ретротранспозонів або ретровірусів (процесовані псевдогени, SINE-елементи ссавців). Не мають кінцевих повторів, містять на одному з кінців **сегмент з A/T - пар**.

Контролюючі елементи (*Ac/Ds*) кукурудзи

***Ac* (від *activator*) – автономний елемент**



Ds* (від *dissociation*) – неавтономні елементи. Виникають у результаті делецій в *Ac



Транспозиції *Ds* відбуваються лише тоді, коли в геномі присутній *Ac*

Інсерції *Ac* та *Ds* викликають появу дуплікацій ДНК-мішені по 8 п.н.



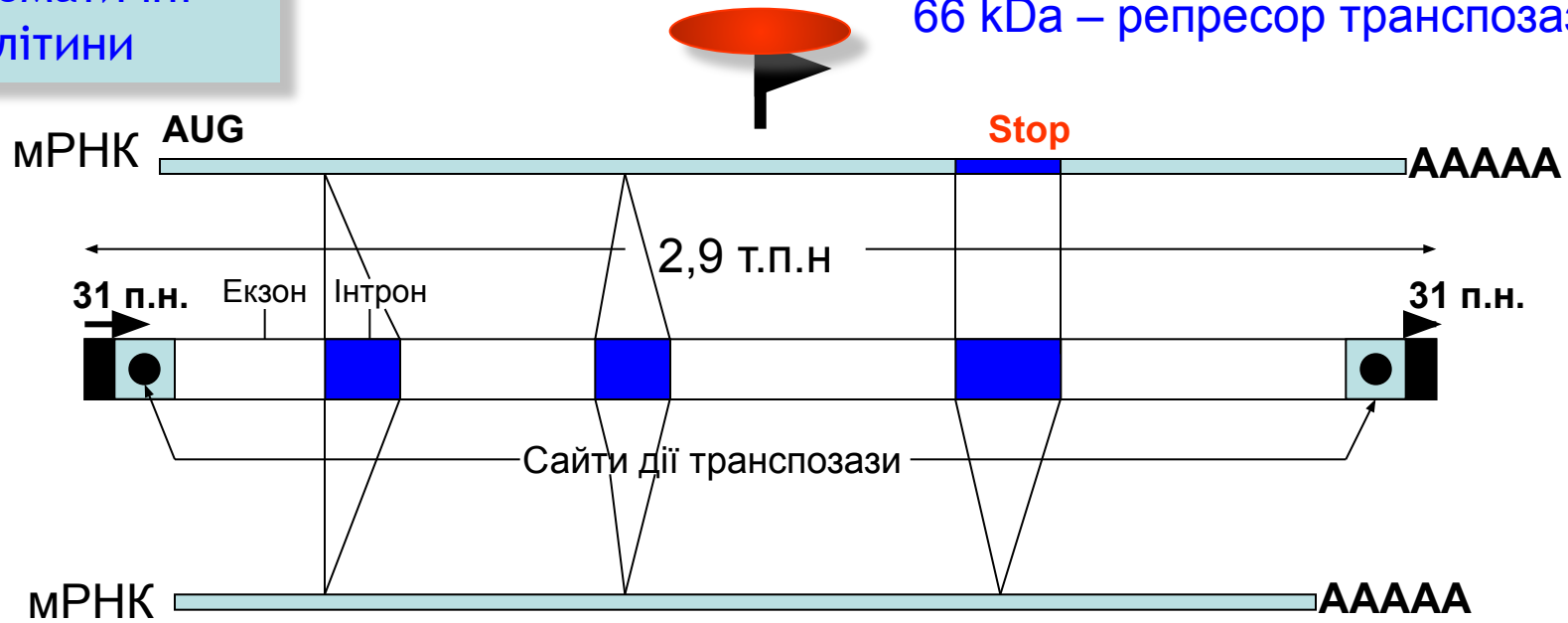
Ротики садові (*Antirrhinum majus*)

- ❑ Лінія, клітини якої несуть активний транспозон ***Tam3*** (3629 п.н., містить ***ORF***, що кодує транспозазу з 749 амінокислотних залишків)
- ❑ Інсерція ***Tam3*** в локус ***pallida*** пошкоджує синтез антоціаніну (білий колір)
- ❑ Якщо транспозон покидає цей локус, то синтез пігменту відновлюється (червоні плями)
- ❑ Чим раніше це відбулося під час розвитку квітки, тим більший клон клітин, що синтезують антоціанін, та більші розміри червоних плям

P – елемент дрозофіли

Соматичні клітини

66 kDa – репресор транспозази



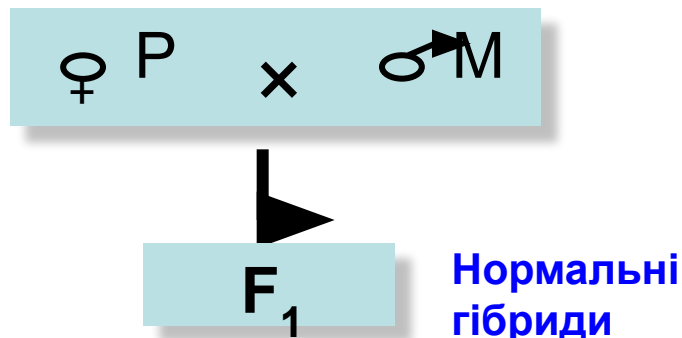
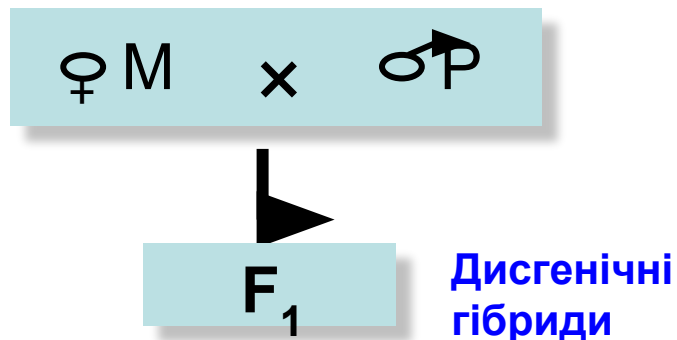
Генеративні клітини

87 kDa - транспозаза

Повний P-елемент має розмір **2,9 т.п.н.** Неповні (результат делецій) - від **0,5 до майже 2,9 т.п. н.** Білки, що кодуються P-елементом є результатом **альтернативного сплайсингу**. В **соматичних** клітинах видаляються перших **два** інтрони і під час трансляції мРНК (**2,5 т.п.н**) утворюється **репресор транспозиції** (4-й екзон не транскрибується). У **генеративних** клітинах видаляються всі інтрони та під час трансляції мРНК утворюється **транспозаза**

Явище гібридного дисгенезу, зумовлене Р - елементами

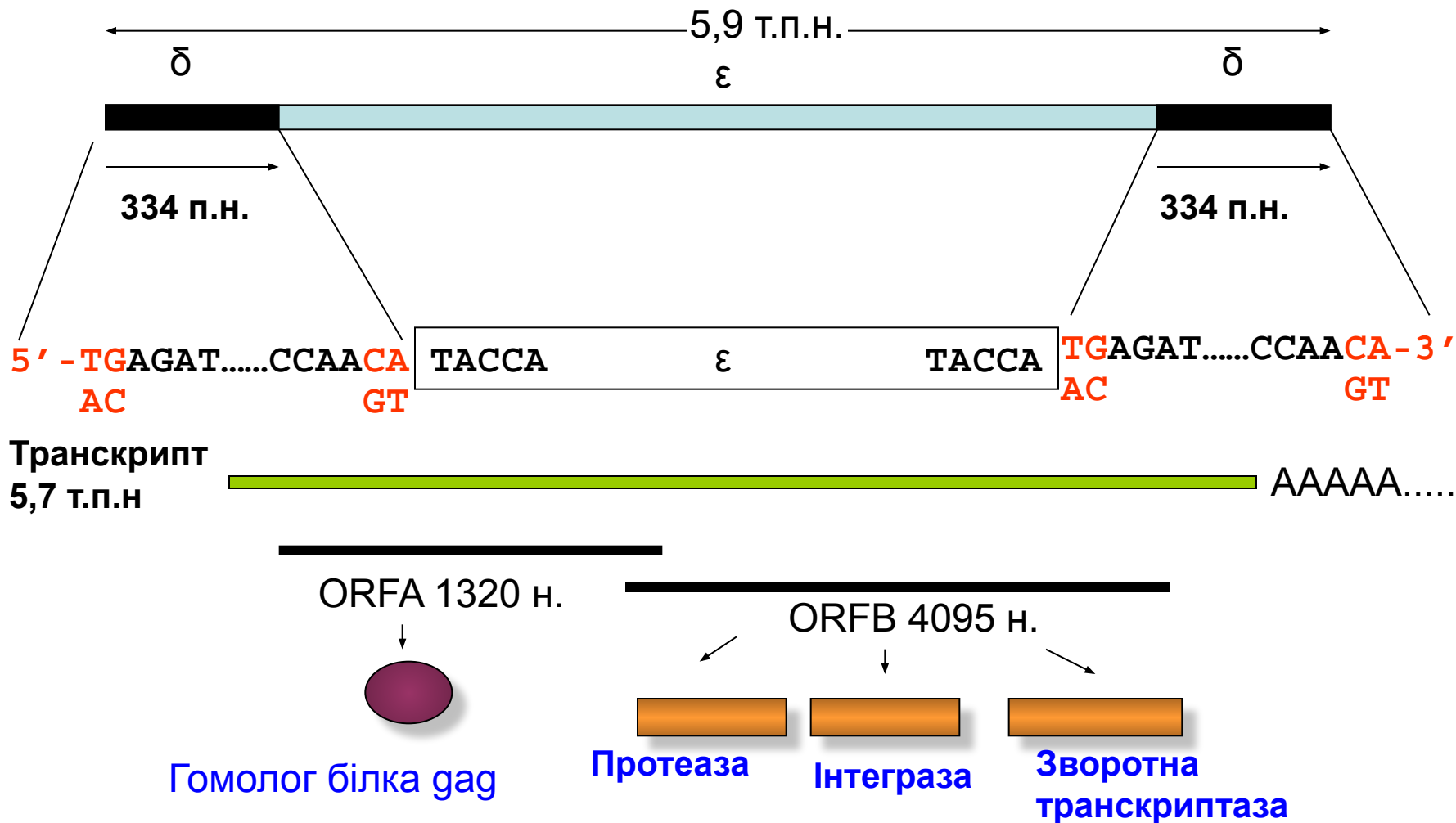
- ❑ Є лінії дрозофіли, що несуть від 30 до 50 копій Р-елементів (Р-лінії)
- ❑ Кількість копій Р-елементів та їхня локалізація варіює від лінії до лінії
- ❑ В клітинах Р-ліній транспозиція Р-елементів не відбувається (завдяки присутності репресора транспозиції)
- ❑ Є лінії дрозофіли, які не містять Р-елементів (М-лінії)



- Під час запліднення хромосоми самця, що містять Р- елементи. потрапляють у середовище цитоплазми яйцелітин М-лінії, що не містила репресора транспозиції.
- Це призводить до активації переміщень Р- елементів в клітинах гібридів та виникнення великої кількості мутацій як наслідку інсерцій Р-елементів (гібридного дисгенезу)
- Гібриди F₁ часто є стерильними. Якщо вони фертильні, то мутації відбуваються у їхніх нащадків
- Гібридний дисгенез не виникає, коли в схрещуванні беруть участь самки Р-ліній, в клітинах яких присутній репресор

- **Гібридний дисгенез** – це комплекс аномалій, зумовлений попаданням мобільних елементів **P** (або **I**) в цитоплазму **M** (або **R**) типу. Характеризується підвищеною мутабільністю, хромосомними перебудовами, нерозходженням хромосом, аномальною рекомбінацією у самців, стерильністю гібридів.
- Оскільки гібридний дисгенез перешкоджає схрещуванню, його вважають сходинкою на шляху до видоутворення.

Ty – елемент *Saccharomyces cerevisiae*

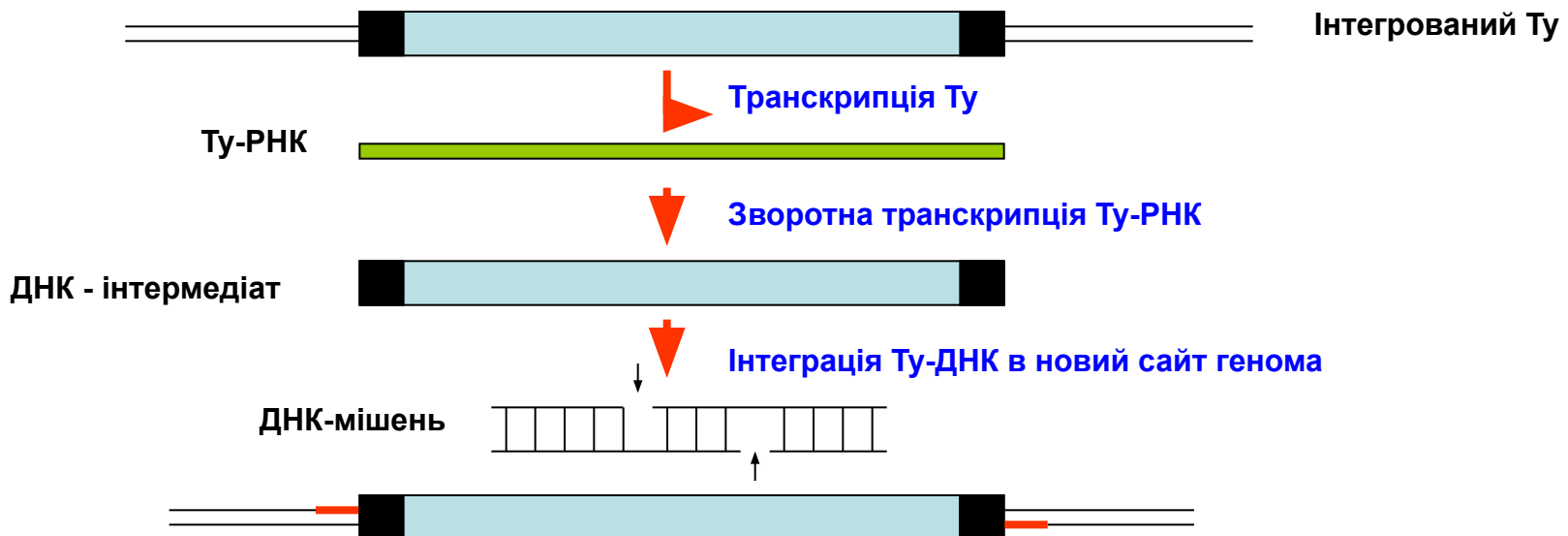


Ty –елемент кодує гомологи білків ретровірусів (крім env)

Ефекти *Ty*-елементів

- У клітинах *S. cerevisiae* ~ **30** повних *Ty*-елементів і ~**100** δ -елементів
- Інсерції *Ty* - елементів індукують генні та хромосомні мутації, зумовлюють дуплікації ДНК-мішені (**5 п.н.**) та можуть впливати на транскрипцію сусідніх генів (функціонують як *рухомі промотори-регулятори*)
- *Ty*-елементи активно транскрибуються : **5-10%** поліА-РНК в клітинах – це *Ty*-РНК
- Рівень трансляції *Ty*-РНК низький. У клітинах дріжджів можуть з'являтися вірусоподібні частинки, які містять білок **48 kDa** – продукт **ORFA**, зворотну транскриптазу та *Ty*-РНК. Частинки не інфекційні й не покидають клітини

Транспозиція *Ty* відбувається за допомогою зворотної транскрипції *Ty*-РНК



Зворотна транскриптаза (ревертаза)

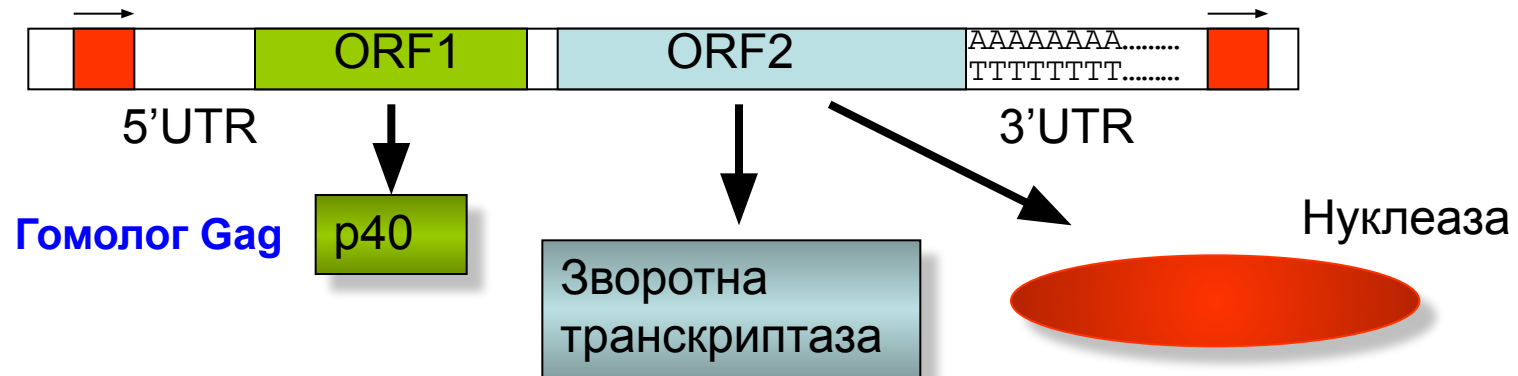
має три ферментативні активності:

- 1) РНК-залежну ДНК-полімеразну;
- 2) РНК-нуклеазну;
- 3) ДНК-залежну ДНК-полімеразну.

Затравкою для синтезу нового ланцюга ДНК є одна з клітинних тРНК

LINE-елементи – представники ретротранспозонів класу II

LINE-1 (від long interspersed nuclear elements) ~ **6,1** т.п.н.



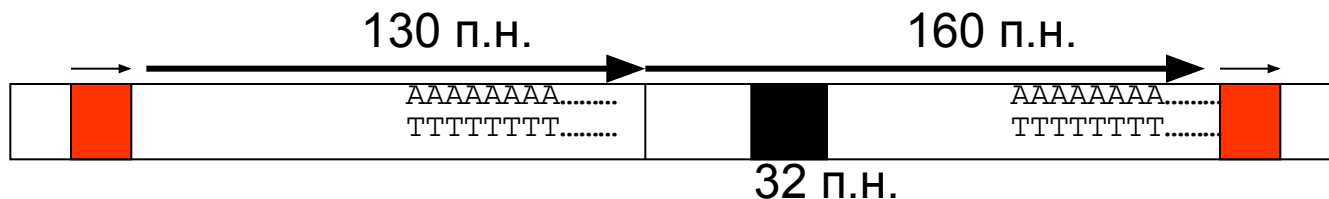
- ❑ Розкидані по геному. В геномі людини ~ **85** тис. копій (**21%** ДНК)
- ❑ Значна частка процесів зворотної транскрипції в клітині пов'язана з транспозицією **LINE**-елементів

Ретрогени (ретропозони) – елементи геному, які є продуктами зворотної транскрипції клітинних РНК; їх переміщення пасивне - за рахунок білків ретротранспозонів та ретровірусів

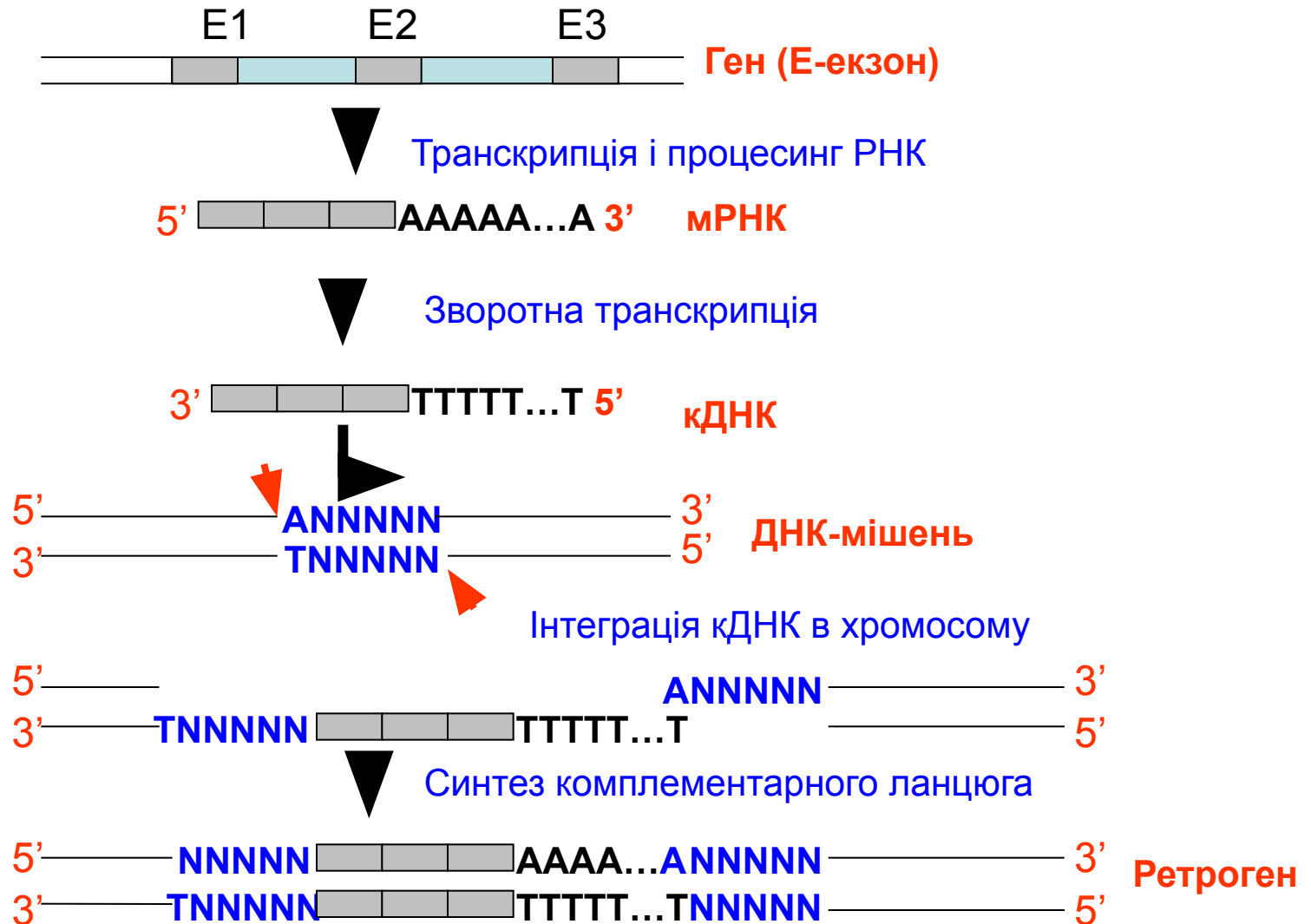
Процесовані псевдогени білків (низькокопійні)

Процесовані РНК-псевдогени

Alu-димер – представник SINE –елементів (short interspersed nuclear elements) людини (1млн.500 тис. копій на геном, ~ 13% ДНК, походить від 7SL-РНК. Довжина 300-500 п.н, на кінцях короткі (7-20 п.н.) прями повтори



Виникнення ретрогенів за допомогою зворотної транскрипції та транспозиції



Значення транспозицій МГЕ

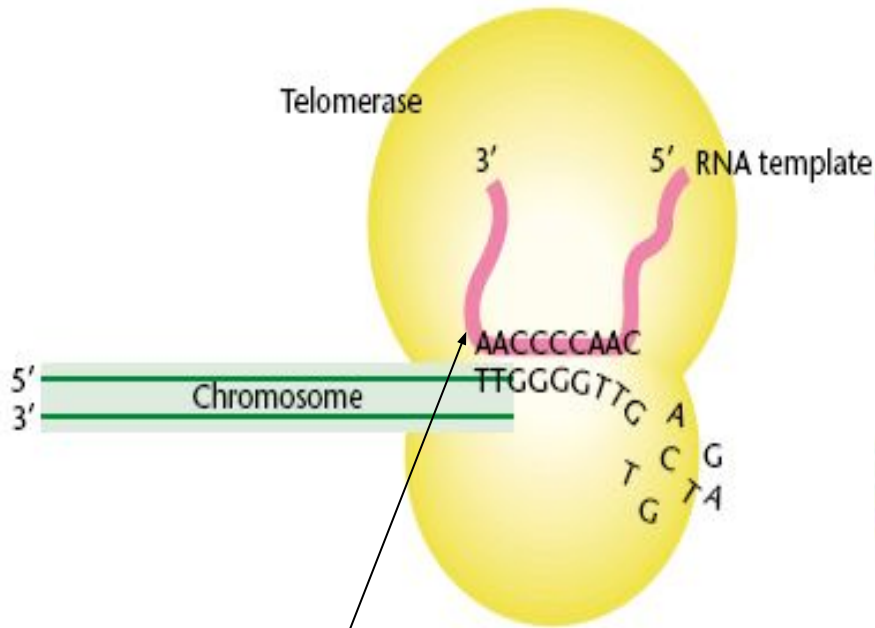
- МГЕ – джерело мінливості молекулярної структури геному, а їхні транспозиції визначають швидкість мутаційного процесу та мають важливе значення в еволюції.
- Мають фіксовані місця на хромосомі, тому їхній “рисунок” можна використати для картування хромосом. За дії індукторів фізичної та хімічної природи частота транспозицій зростає на декілька порядків. Є як випадкові, так і “гарячі” сайти інтеграції. Можуть відбуватися “транспозиційні вибухи” – раптове переміщення по геному різних МГЕ.
- Регулятори генної експресії, можуть при вбудовуванні чи вирізанні як активувати, так і інактивувати гени. Активація гена часто відбувається з промотора МГЕ. У разі вирізання мобільного елемента спостерігається повна або часткова реверсія до норми.
- Можуть індукувати хромосомні аберації (гібридний дисгенез).
- Відіграють роль природних векторів, захоплюють і переносять генетичний матеріал.
- Складають фракцію **selfish** (егоїстичної) ДНК. Продуктів, необхідних для метаболізму клітини, не кодують.

Ядерний геном людини

- ❑ 99% ДНК людини зосереджено в ядрі
- ❑ Розміри молекул ДНК в окремих хромосомах - від ~ 50 млн.п.н. (1,5% ДНК, 21 хромосома) до ~ 250 млн.п.н (8,3% ДНК, 1 хромосома)
- ❑ У геномі людини: унікальні послідовності та малокопійні повторення (два-декілька разів) становлять ~60%, помірні повторення (10^2 - 10^6 разів) ~ 30%, багатокопійні повторення ($>10^6$ разів) ~10%
- ❑ ~ Не >5% ядерної ДНК кодують білки, рРНК, тРНК, мяРНК, мцРНК
- ❑ Кількість генів – біля 25 тис.
- ❑ Середній розмір генів – 10 - 15 т.п.н. Розміри варіюють від <100 п.н. (гени тРНК) до >2,4 млн.п.н (ген дистрофіну X-хромосоми)
- ❑ Середній розмір кодуючої послідовності – 1340 п.н. (у *C. elegans* – 1311 п.н., *D. melanogaster* – 1497 п.н., *E. coli* – 951 п.н.)
- ❑ Переважна більшість генів мають екзон-інтронну будову і є окремими транскрипційними одиницями
- ❑ Первинні транскрипти часто підлягають альтернативному сплайсингу (1858 транскриптів з 544 генів 19 хромосоми)

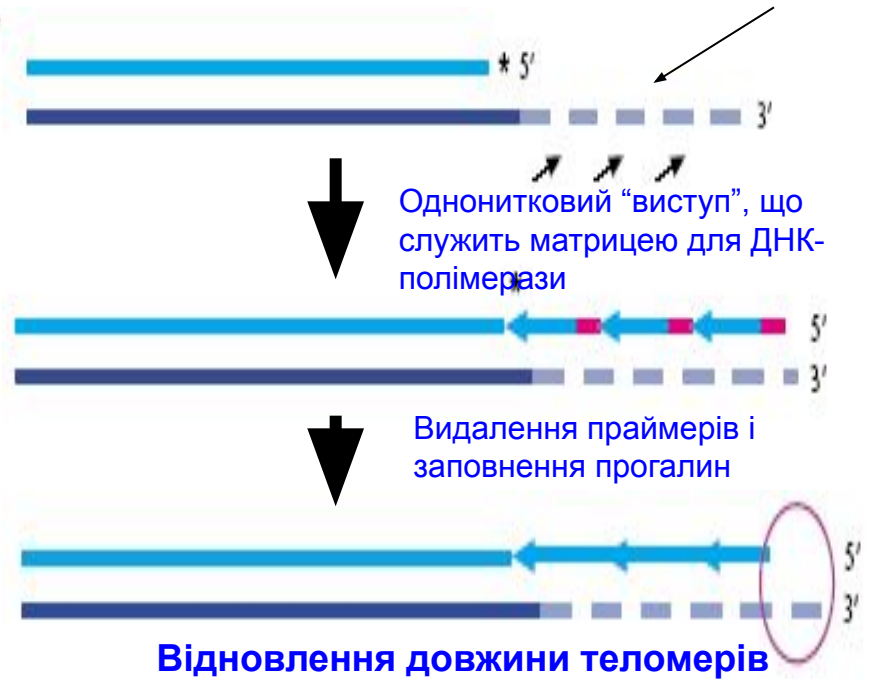
ДЯКУЮ за УВАГУ!

Відновлення теломерних ділянок хромосом теломеразою



Теломераза містить внутрішню РНК-матрицю та може здійснювати зворотну транскрипцію – синтезувати ДНК на матриці РНК

Теломераза видовжує 3'-кінець, додаючи багато копій певної послідовності ДНК



Теломераза неактивна в нормальних соматичних клітинах дорослого організму, але активна в ембріональних клітинах, в клітинах чоловічих статевих залоз, та в ракових клітинах, визначаючи, очевидно, їхню "безсмертність". Вона постійно експресується в клітинах примітивних еукаріотів (*Tetrahymena*)